第12卷　第1期
1991年2月

动物学研究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 12, No. 1
Feb., 1991

穴居狼蛛毒的某些组分对培养的人肺腺癌细胞（SPC-A_1）的致伤作用

赵维勤　吉永华　徐　科
（中国科学院上海生理研究所）

陈振国　沙慧芳　包国良
（上海胸科医院肿瘤研究室）

摘　要

本实验观察了从新疆产穴居狼蛛（*Lycosa singoriensis*）的冻干毒腺中提取的粗毒及其经 Sephadex G-25柱层析分离所得到的各组分对培养的人肺腺癌细胞的杀伤作用：（1）与对正常人胚的肺细胞、正常人淋巴细胞和红细胞相比，穴居狼蛛毒对培养的 SPC-A_1 有明显的高杀伤作用。例如用于杀伤50%的SPC-A_1 细胞所需的粗毒浓度为 25μg/ml，而用于杀伤相同量正常人胚肺细胞和淋巴细胞所需的粗毒浓度分别为600和 500μg/ml，即使将粗毒浓度提高到 2000μg/ml，也只能杀伤 40% 左右的正常人的红细胞。（2）在粗毒的 8 个分离组分中，第Ⅱ、Ⅳ和Ⅶ组分表现出杀伤 SPC-A_1 细胞的活性，尤以后两者为明显。（3）粗毒经100℃加热30分钟后，杀伤 SPC-A_1 细胞的活力稍有下降，但组分Ⅳ和Ⅶ经同样的加温处理后，该活性不变，唯组分Ⅱ在加温后该活性完全丧失。

关键词：穴居狼蛛，蜘蛛毒，培养的人肺腺癌细胞

已知几种蛇毒中的细胞毒素对肿瘤细胞具有不同程度的选择性致伤作用。如眼镜蛇细胞毒性因子可选择地杀伤吉田肉瘤细胞（Braganca，1967），金环蛇细胞毒素对培养的人肺腺癌细胞具有明显的抑制生长和杀伤作用（徐科等，1986 b）。此外，尚有人发现某些昆虫体内存在抗肿瘤物质，引起了人们的注意。如 Itoh等（1985）报道了从苍蝇体内分离出的一种凝集素能有效地杀伤几种肉瘤细胞。

近年来，徐科等（1986 a）对新疆产穴居狼蛛毒进行了研究，观察到该毒可选择地阻遏螯虾的兴奋性接头传递，从而提示其中可能含有阻遏谷氨酸能突触传递的神经毒素。另方面，徐科等（1989）又从穴居狼蛛毒中初步分离一种抑制细菌生长的肽。本工作报道了穴居狼蛛毒和它的某些组分对培养的人肺腺癌细胞株的选择性致伤作用。

上海胸科医院肿瘤研究室戴惠敏同志参加部分技术工作，谨致谢意。
本文1989年4月27日收到，同年8月14日修回。

材料与方法

穴居狼蛛粗毒　如徐科等（1989）所述，先从穴居狼蛛头部取出毒囊，冰冻干燥保存。实验时，取一定数量的干燥毒囊，在2至3倍蒸馏水中制成匀浆，离心（2000 rpm，15分，4℃），取上清液；再向沉淀物中加等体积蒸馏水，匀浆，离心，取上清液；再向沉淀物中加等体积蒸馏水（用1 mol/L醋酸调至pH4.0），匀浆，离心，取上清液。合并上清液，低温干燥，制成干粉，即粗毒。

粗毒的柱层析分离　按文献中所述，用Sephadex G-25柱层析法，将粗毒分成8个明显的蛋白组分（徐科等，1989）。

几种细胞样品的制备　（1）人肺腺癌细胞株（$SPC-A_1$）：为上海市胸科医院肿瘤研究室吴善芳等人（1982）建立的。将该株从液氮中取出经复苏后，用含有20%小牛血清的RPMI-1640配制成细胞悬液，接种在面积为3×6 cm的小培养瓶内，进行静置单层培养（37℃），每三天传代一次。实验时将培养的贴壁细胞用含0.25%胰酶和0.1% EDTA的消化液短暂处理，迅即以培养液冲洗一次，再将细胞配成2×10^6/ml的悬液待用。（2）正常人血液淋巴细胞：取正常人静脉血4 ml，以肝素抗凝，用生理盐水稀释2—3倍备用。取约2ml淋巴细胞分离液（比重1.007）放到试管中，再取等量前述经稀释的全血轻轻地加到淋巴细胞分离液上面，注意使两者之间有明显的分界，然后经2000 rpm离心15分钟。在血清与淋巴细胞分离液之间的白色薄层即为淋巴细胞。用吸管小心地将该薄层吸出，用Hank's液冲洗三次，计细胞数，配成2.0×10^6细胞数/ml的浓度。（3）正常人红细胞：取正常人静脉血，柠檬酸钠抗凝，用0.85%NaCl溶液将红细胞冲洗3—4次，然后用20m*M* Tris等渗盐溶液配成2%(v/v)红细胞悬液。（4）正常人胚的肺细胞：购自上海第二医科大学附属新华医院儿科研究所。实验时将贴壁培养的细胞用消化液消化后，配成2.0×10^6细胞数/ml。

穴居狼蛛毒及其组分对上述细胞的毒性检测　几种细胞制备的检测方法相同，均在试管中进行。先向每管加0.1 ml的细胞悬液，再将等体积含不同浓度的（用0.85% NaCl生理溶液配制）毒溶液分别加入上述试管中，每种浓度的毒溶液均为2管，在37℃水浴中保温30分钟，用1%台酚兰染色检查细胞死亡率，测出致死50%所需毒液浓度。

溶血作用的检测　参照Habermann等人（1981）的方法进行，作部分改进。取2%红细胞悬液0.5ml，加0.5*M* $CaCl_2$ 16μl，再加用20m*M* Tris等渗溶液配制的不同浓度的毒液，使总体积为1 ml，使红细胞最终浓度为1%，在37℃保温30分钟，然后离心（4000rpm，5分钟），取上清液在A_{540}测其OD值。以蒸馏水代替等渗Tris溶液的样品的OD值作为100%溶血的参照，测定引起50%溶血的毒液浓度。空白对照为不加毒液者。

粗毒及其有效组分的热稳定性实验　先将粗毒或其有效组分的溶液在100℃条件下加热30分钟，再按上述方法测试它们对$SPC-A_1$细胞的毒性。

结果与讨论

一、粗毒对几种细胞致伤毒性的比较　测试了不同浓度的粗毒溶液对人肺腺癌细

胞株（SPC-A1）细胞、人胚肺细胞以及淋巴球和红细胞致伤毒性作用。结果表明，这些细胞的敏感性之间有显著差异。一般说来，杀死人肺腺癌细胞50%的毒液浓度为 25μg/ml，但即使用250—300μg/ml 的毒液杀死人胚肺细胞、淋巴细胞和红细胞等正常细胞仅在 10—20% 之间；若把毒液浓度增到 100μg/ml，则可杀死前者的90%，但对后三者，特别是对红细胞，即使把毒液浓度增加到 2000μg/ml，杀死率也只在40%（图 1）。

从图 1 可见，穴居狼蛛粗毒对人肺腺癌细胞有明显的选择性致伤作用。

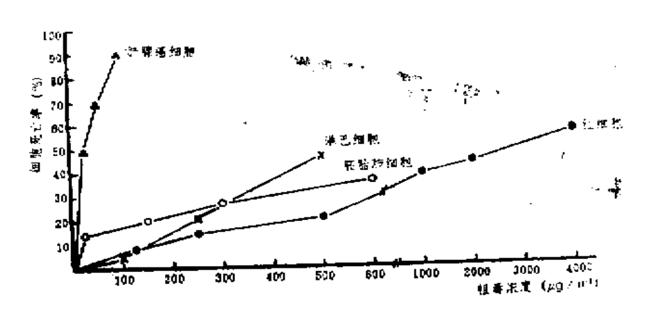


图 1　不同浓度的穴居狼蛛毒对培养的SPC-A1及几种正常细胞的致伤作用

二、粗毒组分对人肺腺癌细胞的致伤作用　穴居狼蛛粗毒经过 Sephadex G-25柱层析被分为 8 个较为明显的蛋白峰（图 2）。

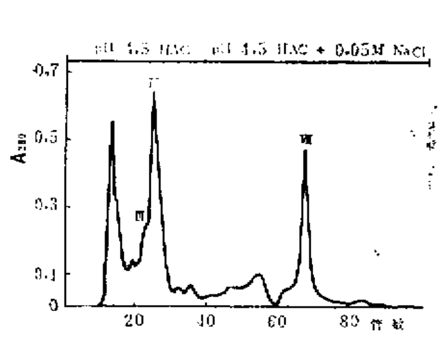


图 2　穴居狼蛛粗毒经 Sephadex G-25 分离图谱

表 1　穴居狼蛛毒各组分杀伤人肺腺癌细胞的活性

层析洗脱组分 (100μg/ml)	对 SPC-A1 细胞的杀伤作用
峰 Ⅰ	－
峰 Ⅱ	－
峰 Ⅲ	＋
峰 Ⅳ	＋＋
峰 Ⅴ	－
峰 Ⅵ	－
峰 Ⅶ	－
峰 Ⅷ	＋＋

－　表示无杀伤作用。＋　表示杀伤 50%以上细胞。
＋＋　表示杀伤90%以上细胞。

毒力测试结果表明，峰Ⅲ、Ⅳ和Ⅷ具有致伤癌细胞活性（表 1）。

如表所示，峰Ⅲ的活性较弱，当蛋白量为 100μg/ml 时，破坏人肺腺癌细胞数为55%，但相同浓度的峰Ⅳ和峰Ⅷ的杀伤率为90以上。

三、粗毒及其活性组分的热稳定性　经过100℃保温30分钟后，粗毒的杀伤人肺腺癌细胞活性稍有下降，峰Ⅳ和峰Ⅷ的活性不变，但峰Ⅲ的活性消失（表 2）。

由于峰Ⅳ和峰Ⅶ具有较好的热稳定性，所以在两组分所含的抗癌细胞活性物质可能是同类多肽，但峰Ⅱ的活性既弱，又缺乏热稳定性，所以其中所含的应是另一类物质。粗毒经热处理后的轻微的活性下降可能与此峰有关。

关于徐科等（1989）在穴居狼蛛毒中所分离的抗菌活性肽与峰Ⅳ和峰Ⅶ的关系，目前尚不能肯定，因为两者的分离手段不同。但是已观察到，峰Ⅳ和峰Ⅶ也具有抗菌活性，并且在8个峰中唯有这两个峰具有抗菌活性。由此看来，抗菌物质与抗癌细胞物质即使不是同一物质，也应有密切关系。我们曾试图对两个活性峰作进一步分离纯化，但由于粗毒量所限及其它一些技术上的原因，尚未能建立可行的纯化方法。

表2 穴居狼蛛毒粗及活性组分经热处理前后的的活性比较*

活性成分（100μg/ml）	SPC-A_1细胞死亡率(%)	
	加热前	加热后
粗 毒	80	81
Ⅱ 峰	55	4
Ⅳ 峰	96	93
**Ⅶ 峰		91

* 100℃加热30分钟。

** Ⅶ峰因样品全部被加热，故加热前未做对照。

蜘蛛的毒液是它在进化中获得的攻防武器和兼有消化功能的消化液。在这种意义上蜘蛛毒和蛇毒是相似的。它们是一类链长为60余个氨基酸残基的多肽。由于它们对细胞的普遍性作用而被称为细胞毒素。看来，蛇毒细胞毒素与蜘蛛的抗癌细胞活性物质可能不是同一类物质。

七十年代以来，昆虫免疫研究有了迅速发展。当昆虫受到伤害性刺激时，便在体内诱发出如溶菌素、凝集素和抗菌肽等活性物质。Itoh等（1985）报道的一种凝集素（sarcophaga lectin）具有抗癌细胞作用，但凝集素为糖蛋白，具有特殊的作用方式，与本文所报道的穴居狼蛛毒抗癌细胞物质应是不同的。至于抗菌肽，一般链长约为36—37个氨基酸残基的强碱性肽，也具有热稳定性，但它们是昆虫体受到伤害性刺激时被动产生的。它们的杀菌机制可能是在细菌外膜上"打洞"，引起膜内某些物质外漏，而导致细菌死亡。它与本文报道的抗癌细胞物质，以及前文（徐科等，1989）报道的抗菌肽的关系值得研究。

本工作虽是初步的，但穴居狼蛛毒对培养的人肺腺癌细胞和正常人胚肺细胞的致伤作用之间所呈现的显著差异提示，在该毒中可能存在一种新型的活性物质。

参 考 文 献

吴善芳等 1982 人体肺腺癌细胞株（SPC-A_1）的建立及其生物学特性。中国科学B辑(10)：913—921。

徐科等 1986a 穴居狼蛛毒对螯虾兴奋性接头电位的阻遏作用。生理通讯 增刊号1页。

徐科等 1986b 金环蛇细胞毒素对人肺腺癌细胞的致伤作用。两栖爬行动物学报 5(4)：278—281。

徐科等 1989 穴居狼蛛（*Lycosa singoriensis*）毒中的一个抗菌活性多肽的鉴定和纯化。动物学报 35(3)：300—305。

Braganca B. M. *et al.* 1967 Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta,* 136:508—520.

Habermann E. *et al.* 1981 Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics. *Biochim. Biophys. Acta,* 649(2):481—486.

Itoh A. *et al*. 1985 Antitumor effect of sarcophaga lectin on murine transplanted tumors. *Jpn. J. Cancer Res*. (Gann), 76:1027—1033.

CYTOPATHIC ACTION OF SPIDER (*Lycosa singoriensis*) VENOM AND ITS FRACTIONS ON THE CULTURED HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA CELL (SPC-A_1)

Zhao Weiqin Ji Yonghua Xu Ke

(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences)

Cheng Zhenguo Sha Huifang Bao Guoliang

(Shanghai Chest Institute)

The spider crude venom (SV) was extracted from lyophilized poison glands of *Lycosa singoriensis* and was fractionated by means of chromatography on Sephadex G-25 into 8 fractions. It was shown that the minimal dosa of SV to kill 50% (MD_{50}) of the cultured human lung adenocarcinoma cells (SPC-A_1) was 25 μg/ml, whereas even 600 μg/ml of SV killed only 30% of the cultured human embryonic lung cells. Human lymphocytes were nearly as resistant as the embryonic lung cells and MD_{50} of SV on human erythrocytes was more than 4000 μg/ml. The cytopathic activity on the adenocarcinoma cells was found in fractions Ⅰ, Ⅳ and Ⅶ. Moreover, the cytopathic activity of fraction Ⅳ and Ⅶ was found to be heat resistant (100℃, 30 min), but that of fraction Ⅰ was disappeared after the heat treatment.

Key words: *Lycosa singoriensis*, Spider venom, Cultured human lung adenocarcinome cell